

Alimentos funcionales

Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación

E. Lecumberri*, R. Mateos*, S. Ramos*, M. Alía*, P. Rúperez*, L. Goya*, M. Izquierdo-Pulido** y L. Bravo*

*Instituto del Frío (CSIC), Departamento de Metabolismo y Nutrición, Madrid **Facultat de Farmacia, Departament de Nutricio i Bromatologia, Barcelona. España.

Resumen

Objetivos: El objetivo de este trabajo era caracterizar la composición de la fibra de cacao, estudiar su contenido en polifenoles y capacidad antioxidante *in vitro*, e investigar el efecto de la administración de un extracto polifenólico de dicha fibra sobre la capacidad antioxidante en suero de ratas.

Material y métodos: Se analizó la composición en fibra dietética (FD) y el contenido polifenólico de la fibra de cacao (FC), así como la capacidad antioxidante mediante la determinación de su poder reductor (FRAP) y de secuestro de radicales libres (ABTS). Asimismo, se administró a ratas Wistar adultas mediante sonda gástrica un extracto rico en polifenoles de cacao (100 mg/kg de peso del animal) procedente de la FC, a fin de estudiar la biodisponibilidad de los mismos, tomándose muestras a distintos intervalos de tiempo.

Resultados: La fibra de cacao mostró ser una excelente fuente de FD, con un alto contenido de fibra total, superior al 60% de masa seca, con predominio de fracción insoluble (83%). Esta fibra contuvo sólo un 1,15% de polifenoles, con reducidos valores de capacidad antioxidante.

Tras la administración intragástrica de extractos ricos en polifenoles de FC se observó una rápida y apreciable absorción de los polifenoles de la fibra de cacao, siendo la epicatequina el principal polifenol detectado en sangre. Paralelamente se produjo un incremento significativo, aunque transitorio, de la capacidad antioxidante en suero, entre los 10-45 minutos postgavage, momento en que empezó a disminuir hasta alcanzar valores basales al cabo de 6 h.

Conclusiones: La FC se puede considerar como una excelente fuente de FD, principalmente de fibra insoluble, por lo que podría ser utilizado como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos en fibra dietética.

Además de los beneficios asociados a su elevado conte-

CHARACTERIZATION OF COCOA FIBER AND ITS EFFECT ON THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF SERUM IN RATS

Abstract

Objectives: The aim of this study was to characterize the physico-chemical properties of cocoa fibre (CF), to analyze its polyphenolic content and antioxidant capacity *in vitro*, and to investigate the effect of the administration of a polyphenolic extract of this cocoa fiber on the antioxidant capacity of the serum in rats.

Methods and materials: Dietary fiber (DF) composition and polyphenolic (PP) content of the cocoa fiber were analyzed. The antioxidant capacity of the CF was determined by means of its reduction power (FRAP) and the capacity to scavenge free radicals (ABTS^{•+}). To evaluate the bioavailability and the antioxidant capacity *in vivo* of the phenolic compounds of CF, an extract of these compounds was administered in the stomach of the rats with a gastric probe (100 mg PP/kg), taking blood samples at different time intervals. Sera were analyzed by HPLC to determine the presence/absence of PP or PP-metabolites. In order to evaluate the antioxidant capacity of the serum FRAP and ABTS methods were used.

Results: Cocoa fiber was an excellent source of DF, with a high content of total dietary fiber (TDF), over 60% of the dry matter, made up mainly of insoluble dietary fiber (IDF; 83% of TDF). This fiber had just 1,15% of polyphenols, with low antioxidant activity. After intragastric administration of the PP-rich fraction a fast and measurable absorption of the CF polyphenols was observed, being epicatechin the main PP in blood. The absorption of this PP confers a significant, although transitory increase of the serum antioxidant capacity 10-45 minutes post-gavage; after this time, the antioxidant capacity progressively decreased reaching basal levels after 6 h.

Conclusions: Cocoa fiber can be considered as an excellent source of DF, mainly insoluble dietary fiber; therefore, it could be used as an ingredient in fiber-rich functional foods. Besides the benefits derived from its high fiber content, the CF would provide protection against oxidative damage by means of its content in phe-

Correspondencia: Dra. Laura Bravo
Departamento de Metabolismo y Nutrición
Instituto del Frío (CSIC)
C/ José Antonio Novais, 10
28040 Madrid
E-mail: lbravo@if.csic.es

Recibido: 28-X-2005.
Aceptado: 7-IV-2006.

nido en fibra, este producto aportaría protección frente a estrés oxidativo gracias a su contenido en polifenoles (epicatequina) que son absorbidos tras su ingesta contribuyendo a la actividad antioxidante en sangre.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:622-28)

Palabras clave: *Fibra de cacao. Fibra dietética. Capacidad antioxidante. Polifenoles. Biodisponibilidad. Ratas.*

Introducción

El cacao, ampliamente utilizado en la industria agroalimentaria, podría ser una excelente fuente de fibra dietética (FD), pues contiene hasta un 12% de fibra¹. La fibra de cacao (FC), a su vez, podría constituir un ingrediente funcional con un papel activo en el mantenimiento de la salud humana y en la prevención de determinadas enfermedades con elevadas tasas de incidencia en las sociedades actuales, como las enfermedades cardiovasculares o el cáncer. Las dos características principales que contribuirían en mayor medida a este papel saludable de la FC serían, presumiblemente, su elevado contenido en FD y una elevada capacidad antioxidante derivada de su contenido en compuestos fenólicos.

Los beneficios de una dieta rica en FD están ampliamente reconocidos y documentados bibliográficamente². Así, un alto consumo en fibra insoluble está íntimamente relacionado con un efecto saciante, regulador del tracto intestinal y preventivo de enfermedades gastrointestinales³⁻⁶. En el caso de la fibra soluble, los principales efectos derivados de su consumo son la disminución de la absorción y aprovechamiento de azúcar, colesterol y triglicéridos. Estos efectos se traducen en la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y en un mayor control de los niveles de glucosa en sangre, lo que adquiere especial relevancia en situaciones de diabetes^{7,8}. El consumo de fibra parece estar relacionado, además, con la prevención de determinadas enfermedades intestinales como el cáncer de colon, gracias a los productos derivados de la fermentación de la fibra soluble por parte de las bacterias de la flora colónica y por una mayor dilución de agentes potencialmente cancerígenos en el contenido intestinal gracias a la presencia de la fibra dietética⁹⁻¹¹.

Por otro lado, el cacao está reconocido como importante fuente dietética de antioxidantes dado su elevado contenido en compuestos fenólicos (procianidinas y flavanoles principalmente)¹²⁻¹⁴. Pueden distinguirse tres grupos principales de polifenoles en el cacao: catequinas o flavan-3-oles (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La principal catequina es la (-)epicatequina, que supone aproximadamente el 35% del total de polifenoles presentes en el cacao¹⁴.

Existe gran número de estudios que relacionan este contenido en polifenoles con propiedades antioxidantes tanto *in vitro*¹⁵⁻¹⁸ como *in vivo*¹⁹⁻²³ y la posible relación de

nolic compounds (epicatechin) which are absorbed maintaining the antioxidant properties *in vivo*.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:622-28)

Key words: *Cocoa fiber. Dietary fiber. Antioxidant capacity. Bioavailability. Polyphenols. Rats.*

esta capacidad antioxidante con la prevención del desarrollo de determinadas patologías, como enfermedades cardiovasculares^{19,24-28}, cáncer²⁹⁻³⁵ o procesos inflamatorios^{36,37}. Sin embargo la biodisponibilidad de estos compuestos parece limitada, registrándose valores mínimos en sangre y tejidos tras la ingesta de alimentos ricos en polifenoles³⁸⁻⁴². A pesar de ello existen evidencias epidemiológicas relacionando el consumo de alimentos ricos en flavonoides con menores incidencias de las patologías mencionadas anteriormente⁴³⁻⁴⁷.

El presente trabajo se desarrolló con objeto de evaluar la fibra de cacao como posible fuente dietética de salud, en relación con su contenido en fibra dietética y polifenoles, así como la biodisponibilidad de estos compuestos fenólicos y su efecto sobre la capacidad antioxidante del suero en animales de experimentación.

Material y métodos

Reactivos

El producto de fibra de cacao, objeto del presente estudio, fue suministrado por la empresa Nutrexp, S. A.

ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolína-6-sulfónico)), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico) y enzimas α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa se adquirieron en los laboratorios Sigma (Sigma-Aldrich Co, Madrid). El reactivo Folin-Ciocalteu fue suministrado por Panreac (Panreac Química, S. A., Barcelona), el ácido gálico por Merck (E. Merck, Darmstadt, Alemania), y el TPTZ (2,4,6-tri-(2 piridil)-s-triazina) por Fluka (Fluka Chemie Sigma-Aldrich, Madrid).

Todos los reactivos empleados fueron de calidad química excepto los utilizados para los análisis realizados en HPLC, que fueron de calidad cromatográfica.

Ensayo de biodisponibilidad *in vivo*

Se utilizaron 24 ratas Wistar macho adultas de aproximadamente 250 gramos de peso. Se preparó un extracto del producto rico en fibra de cacao (8,5 mg polifenoles/mL). La dosis de polifenoles suministrada a cada animal fue de 100 mg PP/Kg peso, lo que corresponde con un volumen aproximado de 3 mL de extracto. Este volumen se administró mediante sonda gástrica a animales en ayuno.

Las 24 ratas fueron distribuidas en 8 grupos, de tres

animales cada uno. El grupo control recibió el mismo volumen de agua destilada conteniendo la misma cantidad de azúcares que el extracto de FC. Los otros 7 grupos experimentales corresponden con los diferentes tiempos en los que se sacrifican los animales tras la administración del concentrado de polifenoles de fibra de cacao (10, 20, 30, 45, 60, 120 y 360 min).

El método elegido para sacrificar a las ratas fue la decapitación con el fin de recoger de manera fácil gran volumen de sangre no adulterada con anestésicos, evitando así posibles interferencias en los posteriores análisis. La sangre troncal se centrifugó a 4 °C y se recogieron los sueros que fueron conservados a -80° C hasta su análisis. Sobre estas muestras se valoró la capacidad antioxidante mediante los métodos FRAP y ABTS (ver abajo) y se cuantificaron los PP absorbidos. Para llevar a cabo esta cuantificación, se precipitaron las proteínas séricas mediante la adición de metanol, centrifugando a 4 °C (15 min, 3.000 rpm) y recogiendo los sobrenadantes. Éstos fueron llevados a sequedad y resuspendidos en acetonitrilo: ácido fórmico al 1% (1: 9 v/v), siendo analizados por cromatografía líquida de alta eficacia. Se empleó un HPLC 1100 de Agilent Technologies (Waldron, Alemania), provisto de bomba cuaternaria y detector de diodos en línea. La separación se realizó en una columna Nucleosil 120 RP-18 (0,46 x 25 cm., 5µm tamaño partícula) de Tecknokroma precedida por una precolumna del mismo material. La elución se llevó a cabo con ácido fórmico 1% (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) en un gradiente de elución a 1 mL/min como sigue: de 10% a 20% de B en 20 min, a 25% de B en 10 min, a 30% de B en 10 min, seguido de elución isocrática durante 10 min. Las señales se monitorizaron a 280 y 360 nm en un detector de diodos.

Análisis

Contenido en fibra dietética (FD)

Se determinó el contenido en fibra dietética total, analizando su composición en fibra soluble e insoluble por el método enzimático-gravimétrico de la AO-AC⁴⁸ modificado en nuestro laboratorio, empleando diálisis frente a agua en lugar de precipitación con etanol para obtener la fracción soluble de la fibra dietética⁴⁹. Tras la hidrólisis enzimática (α -amilasa, proteasa, amiloglicosidasa) de los componentes digeribles y la separación de las fracciones soluble (FS) e insoluble (FI) de la fibra, éstas fueron sometidas a hidrólisis ácida con ácido sulfúrico. El residuo restante, lignina Klason (LK) fue cuantificado gravimétricamente. En los hidrolizados se cuantificaron los azúcares neutros (AN) espectrofotométricamente, empleando antrona-tiourea como reactivo y glucosa como estándar⁵⁰, y los ácidos urónicos (AU), también por colorimetría, por el método Scott⁵¹ empleando ácido galacturónico como patrón.

Los contenidos de FD, FS y FI se calcularon como sigue: FD=FS+FI; FS=AN+AU; FI=AN+AU+LK

Contenido en Polifenoles (PP) Totales

Se realizó una extracción orgánico-ácida de la fibra de cacao. Dicho extracto contiene el total de PP extractables presentes en la muestra⁵². Para ello, 1 gramo de FC se extrajo con 40 mL de solución acuosa de metanol (50% v/v) conteniendo 0,8% de HCl 2N. Se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras centrifugar (10 min, 3.000 rpm) se separaron los sobrenadantes y los residuos se extrajeron de nuevo con 40 mL de acetona: agua (70: 30 v/v), repitiendo la centrifugación y combinando los sobrenadantes con los obtenidos anteriormente.

El contenido fenólico total se calculó a partir de la capacidad de reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu⁵³ utilizando ácido gálico como patrón (0-400 ppm). Se llevó a cabo la determinación colorimétrica a 750 nm en un espectrofotómetro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 12 UV/vis). Los resultados se expresan como porcentaje de polifenoles respecto a la masa seca de muestra: equivalentes de ácido gálico/100 gramos muestra seca.

Capacidad Antioxidante *in vitro*

La capacidad antioxidante de la FC *in vitro* se evaluó sobre los extractos metanólico-ácidos por dos métodos complementarios: FRAP^{54,55} y ABTS⁵⁶.

FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power)

Este método determina la capacidad antioxidante de los componentes de la muestra (polifenoles en la FC) para reducir el complejo TPTZ-Fe³⁺. Se llevó a cabo la determinación colorimétrica a 595 nm en un espectrofotómetro termostatzado a 37° C (Beckman DU-640). La curva patrón se preparó a partir de concentraciones conocidas de Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E. Los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como µmol-equivalentes Trolox por gramo de masa seca de FC o por litro en el caso de los sueros.

Método de captación del radical ABTS⁺

Con este método se valoró el poder secuestrante de radicales libres (ABTS⁺) de la muestra. El radical catión ABTS⁺, preformado a partir de la oxidación de ABTS con persulfato potásico (K₂S₂O₈), es reducido gracias a la capacidad antioxidante del patrón (Trolox) o de los componentes antioxidantes (polifenoles) de la muestra. La evidencia colorimétrica de esta reacción es la disminución de la absorbancia, medida a 658 nm en un espectrofotómetro termostatzado a 30° C (Beckman DU-640). Los resultados se expresan como µmol equivalentes Trolox por gramo muestra seca o por litro de suero.

Otras determinaciones

El contenido en grasa de la muestra se determinó tras la extracción con éter de petróleo a 60 °C (Soxtec System HT-6) y se cuantificó gravimétricamente.

El análisis de la proteína presente en la fibra de cacao se llevó a cabo mediante la determinación del nitrógeno total (método Dumas) (analyzer LECO FP-2000). El contenido en proteína se calculó empleando como factor de conversión 6,25.

Resultados y discusión

Composición fibra de cacao: fibra dietética, grasa, proteína, polifenoles

El análisis de la fibra de la FC mostró que este producto es una excelente fuente de fibra dietética, con un alto contenido en fibra total, superior al 60% de la masa seca. Del total de FD un 83%, corresponde a fibra insoluble y el 17% restante a fibra soluble (tabla I). Estos resultados coinciden con los datos recogidos de la bibliografía para cáscara de semilla de cacao (FT 63,6; FI 51,9; FS 11,7)⁵⁷. El contenido en FD de la FC resultó ser superior al correspondiente a alimentos habitualmente consumidos y considerados como “ricos en fibra” tales como frutas frescas (0,1-3,3%), legumbres (9,0-18,7%), verduras y hortalizas (1,0-3,5%) o cereales y derivados (0,6-2,7%)⁵⁸. El contenido en fibra de estos alimentos está expresado respecto al peso fresco y el de la FC analizada respecto a peso seco, pero teniendo en cuenta que el porcentaje de humedad de la muestra (aprox. 7%) y de los alimentos mencionados (25-30% en cereales y legumbres y > 80% en frutas y verduras)⁵⁹, la FD presente en la FC es significativamente superior.

Al comparar el contenido en FD del producto de fibra de cacao analizado con los valores descritos para composición en fibra dietética de un producto similar al cacao como es la algarroba (*Prosopis pallida*, L) se encuentra que, en peso seco, ésta contiene un total de 53% en FT (47% FI, 6% de FS)⁵⁸. Estos valores de FD son algo inferiores a los encontrados para FC.

Dado que uno de los objetivos del estudio era evaluar la posibilidad de utilizar el producto de fibra de cacao como suplemento o ingrediente alimentario de alto contenido en fibra, se comparó el contenido y composición en FD de dicho producto con un suplemento de fibra descrito en la bibliografía (Vitis fibre)⁶⁰ encontrando que los valores de FD de la FC son superiores a los de este suplemento de fibra procedente de uva, principalmente en la fracción de fibra soluble: FT 50,0%; FI 47,7%; FS 2,3% frente a los valores de FC anteriormente mencionados. De igual forma, la FC mostró po-

ser un contenido en FD superior al de algas como Nori y Wakame que, con contenidos en fibra dietética en torno al 34%, son consideradas como fuentes de FD⁶¹.

Al realizar la misma comparación con suplementos de fibra comerciales⁶² se encontró que los contenidos en FT (65-85%) de estos suplementos fueron superiores a los determinados para la FC (60%). Sin embargo, la composición de esta FT es muy diferente, siendo en los suplementos comerciales mucho mayor la fracción soluble (45-80% frente al 10% del producto de fibra de cacao) y muy inferior la insoluble (3-24% frente a 50% en FC). A la vista de estos resultados el producto de fibra de cacao sometido a estudio podría ser empleado como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos en fibra y/o como suplemento dietético rico en fibra, aunque su mecanismo de acción sería diferente al de la mayoría de los suplementos comerciales existentes debido a la diferente composición de la FD que contiene.

En cuanto al contenido en grasa y proteína los análisis realizados revelaron que la fibra de cacao contiene aproximadamente un 9% de grasa y un 18% de proteína, ambos referidos al peso seco de muestra (tabla I). El porcentaje de grasa del producto de fibra de cacao es significativamente inferior al descrito tanto para el cacao en polvo (13-15%) como para las semillas de cacao (44%)⁶³. En lo que concierne al contenido en proteína (18%) éste se corresponde con los datos bibliográficos de cacao en polvo (19,6%) y es algo superior a lo descrito para semilla de cacao (12%)⁶³.

Por tanto, se puede concluir que el producto procedente del cacao analizado, puede ser considerado como un ingrediente/suplemento alimentario saludable ya que, al margen de su elevado contenido en fibra dietética y su contenido en compuestos antioxidantes, no supone un aporte excesivo de grasa, manteniendo los niveles de aporte de proteína.

El contenido en polifenoles, determinado en el extracto obtenido a partir de la FC por extracción con solución alcohólico-ácida y acetónica, fue de 1,15% del peso seco (tabla II). Este porcentaje es algo superior al documentado para determinados grupos de alimentos de origen vegetal como frutos secos, frutas y verduras⁶⁴. Sin embargo, al compararlo con el contenido total en polifenoles de las semillas de cacao se encuentra que la cantidad de polifenoles determinada en el producto de fibra de cacao sometido a estudio es significativamente inferior al correspondiente a semillas de cacao (6-8% respecto a peso seco)⁶⁵ siendo también inferior, aunque no en tanta medida, al contenido de cacao en polvo (1,9%)⁶³. Presumiblemente, el procesado del cacao llevado a cabo para obtener el producto de fibra de cacao tiene como consecuencia esta severa disminución del contenido en polifenoles.

Capacidad antioxidante in vitro

La capacidad antioxidante de la FC, determinada sobre los extractos polifenólicos, alcanza valores de

Tabla I		
Contenido en fibra dietética, grasa y proteína (% peso seco) de la fibra de cacao		
Fibra	Grasa	Proteína
FT	60,54 ± 0,32	
FS	10,10 ± 0,38	8,87 ± 0,10
FI	50,29 ± 0,70	18,16 ± 0,20

FT: Fibra Total; FS: Fibra Soluble; FI: Fibra Insoluble.

Tabla II

Contenido en polifenoles (% peso seco) de la fibra de cacao. Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol equiv. Trolox/g}$ masa seca), determinada por los métodos FRAP y ABTS

Contenido polifenoles	Capacidad antioxidante
1,15 \pm 0,07	ABTS 7,73 \pm 0,47 FRAP 72,32 \pm 0,67

7,73 μmol -equivalentes Trolox/gramo de masa seca para el método ABTS (capacidad de secuestro de radicales libres) y de 72,32 μmol -equivalentes trolox/gramo de masa seca al valorarlo por el ensayo FRAP (capacidad reductora) (tabla II).

La capacidad antioxidante del producto de FC analizado es significativamente inferior a la reflejada en la bibliografía para productos de origen vegetal como el café (aprox. 200 $\mu\text{mol eq. Trolox/}$ masa seca)⁶⁶. Al comparar los resultados del FRAP de la FC con los análisis realizados por el mismo método para grupos de alimentos pertenecientes a la dieta española (frutos secos, frutas, verduras, legumbres, cereales) se encuentra que éstos tienen una capacidad antioxidante inferior a la de la FC. Sin embargo, comparando la capacidad de secuestro del radical ABTS, la FC muestra valores inferiores a los grupos de frutos secos y fruta, similares a los de verduras y legumbres, y muy superiores a los de cereales⁶⁴. Es importante tener en cuenta que los resultados correspondientes a esos grupos de alimentos son orientativos y, en algunos casos, pueden estar muy alejados de los valores reales ya que cada grupo puede contener alimentos muy diferentes en cuanto a su contenido polifenólico y su capacidad antioxidante.

Ensayo biodisponibilidad *in vivo*

Al analizar la presencia de polifenoles en sueros, procedentes de animales a los que se administró por sonda gástrica un extracto polifenólico de FC se observó la aparición, a los 10 min, de un pico correspondiente a epicatequina. La presencia de este polifenol siguió aumentando de forma gradual hasta alcanzar un máximo de concentración a los 45 min. A partir de ese momento se produjo una disminución progresiva de la concentración sérica de epicatequina. Al cabo de 6 horas tras la administración del extracto no se habían alcanzado niveles basales, existiendo aún concentraciones significativas de este compuesto en sangre (fig. 1).

Este patrón de aparición en sangre coincide con lo reflejado en la bibliografía, que sitúa el pico de mayor concentración de flavanoles en sangre en torno a 1-2 horas tras el consumo de epicatequina o alimentos ricos en este polifenol^{21,40,41,67}.

Tras la administración intragástrica del extracto de PP de la FC, se observó un incremento de un 50% (hasta alcanzar valores en torno a 500 $\mu\text{M eq. Trolox}$) de la capacidad reductora sérica (método FRAP) a los

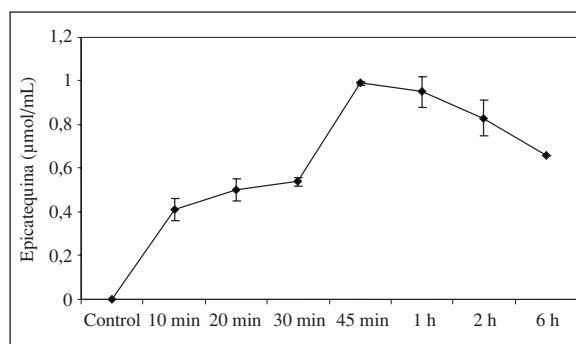


Fig. 1.—Concentración de polifenoles (epicatequina) en suero ($\mu\text{mol/mL}$) de ratas Wistar tras ingestión del extracto concentrado de fibra de cacao, 0-6 h.

10 minutos, que se mantiene hasta los 45 minutos, descendiendo gradualmente hasta alcanzar niveles basales (aprox. 300 $\mu\text{M eq. Trolox}$) a las 6 horas (fig. 2).

Cuando la capacidad antioxidante de los sueros de los animales sometidos a estudio se analizó por el método ABTS se observó un ligero pero significativo incremento del 14% respecto al control a los 45 minutos tras la administración del extracto polifenólico (llegando a valores de aproximadamente 4.000 $\mu\text{M Trolox}$). Desde los 45 minutos hasta las 6 horas la capacidad antioxidante disminuye gradualmente hasta alcanzar los niveles basales (aprox. 3.500 $\mu\text{M eq. Trolox}$) (fig. 3).

Por tanto, se observa que el aumento en la capacidad antioxidante del suero en estos animales fue paralelo al aumento de la presencia de polifenoles en la sangre. Estos resultados revelan que existe una rápida absorción de los polifenoles de la FC, y que la presencia de éstos tiene como consecuencia un incremento en la capacidad antioxidante del suero.

Conclusiones

Teniendo en cuenta los análisis realizados sobre el producto de fibra de cacao, tanto *in vitro* como *in vivo*, se puede concluir que éste podría ser utilizado como fuente dietética de fibra (principalmente insoluble

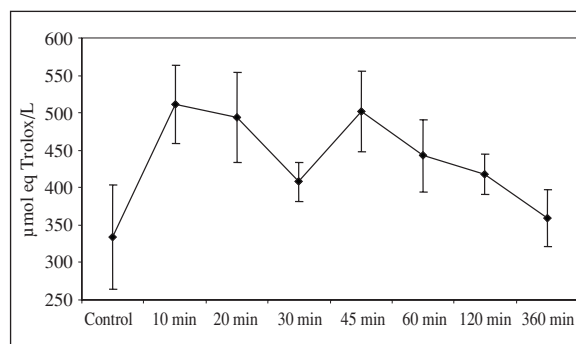


Fig. 2.—Capacidad reductora ($\text{FRAP}_{30\text{min}}$) sérica ($\mu\text{mol equiv. Trolox/L}$) en ratas Wistar tras ingestión del extracto concentrado de fibra de cacao, 0-6 h.

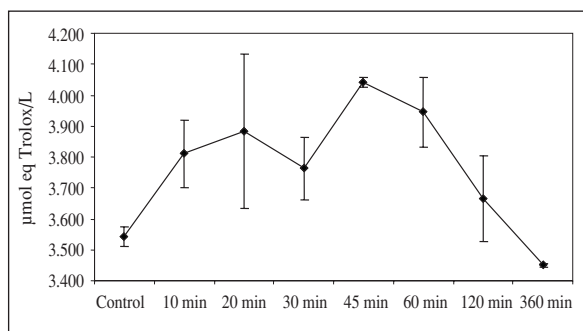


Fig. 3.—Capacidad de captación del radical ABTS en suero ($\mu\text{mol equiv. Trolox/L}$) de ratas Wistar tras ingestión del extracto concentrado de fibra de cacao, 0-6 h.

pero también de fibra soluble) y de compuestos antioxidantes (epicatequina).

Este producto de fibra de cacao puede ser considerado como un potencial ingrediente funcional, ya que, al ser consumido, desarrollaría un doble papel en el mantenimiento de la salud y prevención de ciertas enfermedades. Por un lado, gracias a su elevado contenido en fibra dietética (tanto soluble como insoluble), contribuiría a la regulación del tránsito intestinal, aportando sensación de saciedad y retrasando la absorción de azúcares y grasas, por lo que podría ejercer un papel beneficioso en la prevención de enfermedades gastrointestinales y de otro tipo de dolencias (diabetes, obesidad, etc.). El otro aspecto que confiere a este producto de fibra de cacao propiedades potencialmente beneficiosas para la salud es su contenido en compuestos fenólicos que, si bien no se encuentran en concentraciones elevadas, son incorporados al torrente sanguíneo donde mantienen sus propiedades anti-oxidantes, lo que contribuiría a mantener el equilibrio redox, previniendo de esta manera enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, de alta prevalencia en las sociedades actuales, como enfermedades cardiovasculares o cáncer.

Por todo ello, este concentrado de fibra de cacao podría ser un compuesto de interés para la industria agroalimentaria, empleándose bien como ingrediente alimentario, bien para la formulación de suplementos dietéticos ricos en fibra.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo del Ministerio de Educación y Ciencia (Mateos, R., becaria postdoctoral; Ramos, S., contrato Ramón y Cajal) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Lecumberri, E., becaria predoctoral), así como de la empresa Nutrexp, S. A. y el proyecto AGL2000-1314 de la CICYT.

Referencias

- Valiente, C, Esteban, RM, Mollá, E, López-Andreu, FJ. Effect of roasting on dietary fiber cocoa beans. *J Food Sci* 1994; 59:123-4.
- Estudio FAO Alimentación y Nutrición. 66 (ISSN 1014-

2916): Los Carbohidratos en la Nutrición Humana. ANEXOS 2: Efectos Fisiológicos de la Fibra Dietética. 97-104. Roma. 1999.

- Read, N.W, Eastwood, MA. Gastro-intestinal physiology and function. En: *Dietary Fibre. A Component of Food*, T.F. Schweizer, CA. Edwards, eds. pp. 103-117 London: Springer-Verlag, 1992.
- Cherbut, C. Role of gastrointestinal motility in the delay of absorption by dietary fibre. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49:74-80.
- Cummings, J.H. The effect of dietary fiber on fecal weight and constipation. En: *CRC Handbook of dietary fiber in human nutrition*, Spiller, G.A, ed. Boca Raton: CRC Press, pp. 263-349. 1993.
- Salvador V, Cherbut C. Régulation du transit digestif par les fibres alimentaires. *Cah Nutr Diet* 1992; 27:290-7.
- Dunaif G, Schneeman BO. The effect of dietary fiber on human pancreatic enzyme activity *in vitro*. *Am J Clin Nutr* 1981. 34:1034-5.
- Wolever TMS. *In vitro* and *in vivo* models for predicting the effect of dietary fiber and starchy foods on carbohydrate metabolism. En: *Dietary Fiber in Health and Disease*. Kritchevsky, D, Bonfield, C, eds. pp. 360-377. Eagan Press, St. Paul, MN. 1995.
- Bingham S, Day N, Luben y cols. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet* 2003; 361:1496-1501.
- Bordonaro M, Lazarova D, Carbore R, Sartorelli A. Modulation of Wnt-specific colon cancer cell kill by butyrate and lithium. *Oncol Res* 2004; 14:427-38.
- Orchel A, Dzierzewicz Z, Parfiniewicz B, Weglarz L, Wilczok T. Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells in PCR and JNK dependent. *Dig Dis Sci* 2005; 50:490-8.
- Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr* 2000; 130:2089-92.
- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE y cols. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 1999; 47:4184-8.
- Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int* 2000; 33:423-47.
- Ottaviani J, Carrasquedo F, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH, Fraga CG. Influence of flavan-3-ols and procyanidins on UVC-mediated formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys* 2002. 406:203-8.
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bohwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1995; 322(2):339-46.
- Vinson JA. Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. En: *Manthey, J.A. Buslig, B.S. Flavonoids in the Living System*. Plenum Press pp. 151-164. New York. 1998.
- Osman H, Nasarudin R, Lee SL. Extracts of cocoa (Theobroma cacao L.) leaves and their antioxidant potential. *Food Chem* 2004; 86:41-6.
- Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T y cols. Dark chocolate consumption increase HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Rad Biol Med* 2004; 37(9):1351-9.
- Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, DeSantis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 2003; 424:1013.
- Rein D, Lolito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: *in vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 2000; 130:2109-14.
- Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensuna JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. A dose-dependent effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 2000; 130:2115-9.

23. Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:596-602.
24. Kondo K, Hirano R, Matsumoto A, Igarashi O, Itakura H. Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *The Lancet* 1996; 348:1514.
25. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak M, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Review: vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 2004; 500:299-313.
26. Samman S, Lyons Wall PM, Cook NC. Flavonoids and coronary heart disease: dietary perspectives. En Rice-Evans, C.A, Packer, L. *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker Inc. pp. 469-481. New York, Basel, Hong Kong. 1998.
27. Leake DS. Effects of flavonoids on the oxidation of low-density lipoproteins. En: Rice-Evans, C.A, Packer, L. *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker Inc. pp. 253-276. New York, Basel, Hong Kong. 1998.
28. Pollete A, Lemaitre D, Lagarde M & Véricel E. N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. *Thromb Haemos* 1996; 75(6):945-9.
29. Xu M, Dashwood RH. Chemoprevention studies of heterocyclic amine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 1999; 143:179-83.
30. Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol* 2000; 38:467-71.
31. Weisburger JH. Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future. *Mut Res* 2001; 480-1:23-35.
32. Williamson G, Plumb GW, Uda Y, Price KR, Rhodes MJC. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hep al clc 7 cells. *Carcinogenesis* 1996; 17(11): 2385-7.
33. Suschelet M, Siess MH, Le Bon AM, Canivec-Lavier MC. Anticarcinogenic properties of some flavonoids. En: INRA, Polyphenols. pp. 165-204. Paris: INRA. 1998.
34. Newmark HL. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. En: Back, N, Cohen, I.R, Kritchevsky, D, Lajathaand, A, Paoletti, R. *Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment*. *Plenum Press* pp. 25-34. New York.
35. Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Waehaelae K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vivo* angiogenesis. *Cancer Res* 1997; 57:2916-21.
36. Benavente-García O, Castillo J, Marín FR, Ortuno A, Del Río JA. User and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 1997; 45(12):4505-15.
37. Middleton EJ. Effect of plant flavonoids on immune and anti-inflammatory cell function. En: Mantheyand, J.A, Buslig, B.S. *Flavonoids in the Living System*. *Plenum Press* pp. 175-182. New York.
38. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad Biol Med* 2002; 33(2):220-35.
39. Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizuma T, Nakamura, T, Terao J. Absorption of (-)-epicatechin upon uptake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Rad Res* 2000; 33:635-41.
40. Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Kirkpatrick NJ, Polagruto JA, Ensunsa JL, Schmitz HH, Keen CL. Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sciences* 2003; 73:857-69.
41. Baba S, Osakabe N, Natsume M & Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2[epicatechin-(4_8)-epicatechin] in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 33:142-8.
42. Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord EA. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53:22-6.
43. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C y cols. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1995; 155:381-6.
44. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 1996; 312:478-81.
45. Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. *Arch Intern Med* 1996; 154:637-42.
46. Ferrari, CKB, Torres, EAFA. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed Pharmacother* 2003; 57:251-60.
47. Knekt P, Jarvinen R, Seppänen R y cols. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 1997; 146:223-30.
48. Prosky L, Asp NG, Scheweizer TF, DeVries JW, Furda IJ. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* 1998; 71:1017-23.
49. Mañas E, Saura-Calixto F. Dietary fiber analysis: methodological error sources. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49:158-62.
50. Southgate DAT. *Determination of Food Carbohydrates*. Applied Science Publishers LTD. p. 108. London. 1976.
51. Scott RW. Colorimetric determination of hexauronic acids in plant materials. *Anal Chem* 1979; 51:936-41.
52. Bravo L, Saura-Calixto F. Characterization of the dietary fiber and the *in vitro* indigestible fraction of grape pomace. *Am J Enol Vitic* 1998; 49:135-41.
53. Montreau, F.R. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *Connaiss Vigne Vin* 1972; 24:397-404.
54. Benzie IFF, Strain. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299:15-27.
55. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 2000; 48:3396-402.
56. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:1231-7.
57. Redgwell R, Trovato V, Merinat S, Curti D, Hediger S, Manez A. Dietary fiber in cocoa shell: characterization of component polysaccharides. *Food Chem* 2003; 81:103-12.
58. Bravo L. Propiedades y aplicaciones de la fibra de algarroba (*Prosopis pallida* L.). *Alimentaria* 1999; Marzo: 67-73.
59. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/>
60. Saura-Calixto F. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *J Agric Food Chem* 1998; 46(10):4303-6.
61. Gudiel Urbano M, Goñi I. Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*) as a source of dietary fibre. *Food Chem* 2002; 76:281-6.
62. Goñi I, Martín-Carrón N. *In vitro* fermentation and hydration properties of comercial dietary fiber-rich supplements. *Nutr Res* 1998; 6:1077-89.
63. Chevaux KA, Jackson L, Villar ME y cols. Proximate, mineral and procyanidin content of certain foods and beverages consumed by the Kuna amerinds of Panama. *J Food Comp Anal* 2001; 14:553-63.
64. Saura-Calixto F, Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem* 2006; 94:442-7.
65. Wollgast J, Anklam E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Res Int* 2000; 33:449-59.
66. Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, Espresso and filter). *Food Chem* 2005; 90:133-9.
67. Abrahamse SL, Kloots WJ, Van Amelsvoort JMM. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. *Nutr Res* 2005; 25:305-17.